



TITLE:

計画:10-5 抗ニホンザルおよびIgG,
IgM抗体の作製と定量系の開発(Ⅱ 共
同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

寺尾, 恵治; 藤本, 浩二; 中井, 裕

CITATION:

寺尾, 恵治 ...[et al]. 計画:10-5 抗ニホンザルおよびIgG, IgM抗体の作製と
定量系の開発(Ⅱ 共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報 1992, 22:
68-69

ISSUE DATE:

1992-10-31

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/164361>

RIGHT:

体を2倍階段で希釈して、室温、3時間で反応させた。プレート洗浄後、抗ヒトIgE・ β -D-ガラクトシデース（ファルマシア社）を4℃、一夜反応させた。最後の洗浄後、4-メチルウンベルフェロン- β -D-ガラクトシド（シグマ社）を蛍光基質として加え、その蛍光を測定した。

結果および考察

タゴ社の抗ヒトIgE抗体を用いた蛍光サンドイッチELISA法のみがよくニホンザルおよびカニクイザルの血清によく反応した。他の7種の抗ヒトIgE抗体は、いずれのサル血清にも反応しなかった。これらの結果よりサル血清からのIgE抗体の精製にはタゴ社の抗ヒトIgE抗体を用いるのがよいと思われた。

実際の精製の手順としては、この抗体をCNBr-セファロースに固相化し、イムノアドソーベントカラムを作製する。このカラムにサル血清をかけることにより、免疫化学的にサル血清からIgE抗体だけをカラムに捕まえることが可能と考えられる。（研究協力者：阪口雅弘・今岡浩一）

計画：10-4

遅延型アレルギー炎症発現におけるマクロファージ由来の血液凝固組織因子の役割

今村 隆寿（熊本大・免疫研アレルギー）

中村 伸（京都大・霊長研・生化学）

遅延型アレルギー反応（DHR）は結核病巣、接触性皮炎、移植臓器拒絶反応等に見られる細胞性免疫反応である。皮膚DHRの特徴は硬結であり、その主体はフィブリン沈着とマクロファージ浸潤である。マクロファージは種々の刺激により血液凝固反応の開始因子であるtissue factorを発現することが知られており、また、抗血液凝固剤は硬結形成を抑制する事から、マクロファージの発現するtissue factorがDHRの進展に関わっていると考えられる。そこで、DHRの機序解明の一端として、DHR病変部に浸潤したマクロファージのtissue factor発現の有無を免疫組織学的に検討した。

BCG死菌と不完全フロイントアジュバンドのエマルジョンで感作し4週間後にオールド・ツベルクリンで惹起した日本ザルDHR皮膚病変部を採取し、抗組織因子及び抗フィブリン単クローン抗体を用いた間接法で免疫染色を行った。DHR

病変部には強いフィブリンの沈着が真皮深層から表皮下にかけて認められ、浸潤したマクロファージの一部に組織因子の発現が見られた。これらの結果より、DHR炎症では浸潤したマクロファージの一部が発現する組織因子によって血液凝固反応が誘導され、その結果として産生されたフィブリンが沈着し硬結を特徴とするDHR病変を形成していることが示唆された。

計画：10-5

抗ニホンザルおよびIgG、IgM抗体の作製と定量系の開発

寺尾 恵治（予研霊長類センター）

藤本 浩二（社団法人予防衛生協会）

中井 裕（茨城大）

I型（即時型）アレルギー反応に関与するIgE抗体はその血中レベルが100ng/mlと極く低い。ヒトにおいてはIgEの分離精製が可能である。しかし、旧世界サルでは未だそのような症例は発見されておらず、正常血清からIgEを精製しなくてはならない。本研究では、昨年度ニホンザル血清から分離精製したIgE分画についてモノクローナルならびにポリクローナル抗体の精製を試みた。

モノクローナル抗体は、ニホンザルIgE分画をマウスに免疫し、その脾細胞を常法に従いミエロマ細胞と融合した後、抗体陽性のハイブリドーマ細胞株をクローニングして作成した。その結果、12のクローン（A₁, A₄, A₅, A₆, A₈, A₁₀, B₁, D₁, F₁, F₂, G₉, G₁₂）を得た。これらすべてのクローンは、免疫原であるニホンザルIgE分画を抗原としたELISAで全て抗体陽性（0.D.O. 5<）と判定された。しかし、ニホンザル血清のセファクリルS-300ゲル濾過分画を抗原としたELISAではA₅クローン以外はIgG分画と特異的に反応するパターンを示した。A₅クローンの培養上清はニホンザルIgG、IgM分画にくわえてヒトミエロマ由来IgEに対しても抗体活性を示した。この結果からA₅クローンはヒトおよびニホンザル免疫グロブリンのL鎖に共通な抗原を認識するモノクローナル抗体であると考えられる。

以上、本年度の研究ではニホンザルIgEに特異的なモノクローナル抗体は得られなかった。原因としては、まず正常血清から精製したIgE分画からIgGを除去するのが難しかったこと、また吸収除

去操作をくりかえす過程でIgEが失われ、免疫原としたIgEの絶対量が少なかったことが考えられる。今後は、抗ヒトIgE抗体を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより比較的高純度・高濃度のニホンザルIgE分画を得、これを抗原として抗体の作製を進める予定である。なお、今回得られたモノクローナル抗体はその特異性を解析後、サル類のIgGを識別するモノクローナル抗体として各種検査に利用できるよう活用する。

課 題 11

計画：11-1

α-グロビン遺伝子からみた霊長類の進化

竹中 晃子（名古屋文理短大）

ヘモグロビンのα鎖遺伝子座はヒトでは大部分が二重複している。類人猿について調べたところ、チンパンジーは8割が三重複、1割が四重複、残る1割が二重複であること、オランウータンでは2割が三重複であった。旧世界ザルのカニクイザルでは生息地域により差がみられ、タイ大陸部、フィリピン出自のものは二重複であるのに対し、マレー半島、スマトラ島出自のものは4割が三重複であること、アカゲザル、ニホンザルには三重複の頻度はきわめて少ないことをこれまでに見いだしてきた。赤道直下の熱帯多雨林にはマラリアを媒介する蚊が生息し、事実オランウータンの血液中にマラリア原虫が見いだされ、またスマトラ島のカニクイザルには著しい鉄欠乏貧血が見いだされている。これらの地域に生息する霊長類にαグロビン遺伝子座の重複が多いのではないかという仮説のもとに他の霊長類についてもαグロビン遺伝子座の数を調べるのが本研究の目的である。旧世界ザルの内、トクモンキー4頭、バーバリーマカク2頭、タイワンザル2頭、チベットモンキー2頭、ミドリザル2頭、ドリル1頭はいずれもαグロビン遺伝子は二重複であった。それにたいし、インド南部に生息するシシオザルは二重複のホモ、四重複のホモ、二重複と四重複のヘテロ、二重複と単一遺伝子座のヘテロがそれぞれ1頭ずつ見いだされ、ボンネットモンキー1頭は二重複と単一遺伝子座のヘテロであり変異が大きいことが示唆された。なお、新世界ザルのパンジェ、ヨザル、

マーモセットにも二重複以外に多重複のバンドがみられた。遺伝的浮動による変異の固定とそれに及ぼす環境との関係を明らかにするには数多くの試料を取り扱わねばならないので、今後も試料数を増やしていきたいと考えている。

さらにカニクイザルのαグロビン遺伝子領域に見いだされたプロセスト遺伝子と相同性を示す遺伝子が腎、肝、脳において発現していることが明らかになった。従ってこの遺伝子の霊長類における本来の遺伝子としての進化過程、及びプロセスト遺伝子としての進化過程など今後追求していく予定である。

計画：11-2

霊長類免疫グロブリンCα遺伝子ヒンジ領域の構造変異

河村 正二（東京大・理・人類）

免疫グロブリンCα遺伝子のヒンジ領域はホミノイドでは15塩基を基本単位とした繰り返し構造という特徴をもつ。ヒト及びアフリカ類人猿のCα遺伝子では基本的に15塩基が4回繰り返し構造をもち、テナガザルCα1遺伝子では2回繰り返し構造をもつ。それに対しCα2遺伝子はすべてのホミノイドで単一の15塩基配列からなる。一方旧世界ザルであるカニクイザルでは15塩基配列と相同性をもたない21塩基からなる。他の旧世界ザルでのCαヒンジ領域の構造を知るために、アカゲザル、タイワンザル、ニホンザル、ブタオザル、ベニガオザル、マントヒヒ、パタスモンキー、ミドリザル各数個体について解析した。これらのサルの末梢血より高分子DNAを抽出し、ホミノイドとカニクイザルでよく保存された領域でヒンジ領域をはさむ領域からPolymerase Chain Reaction (PCR)用のプライマーを設定し、PCRを行った。PCRで増幅されたDNAは5%ポリアクリルアミドゲルでシングルバンドであり、サイズはカニクイザルから予想されるものと同じであった。このバンドをゲル中より精製し、PCRプライマーより内側で種間で保存性の高い領域で塩基配列決定用プライマーを設定し、直接塩基配列決定を行った。その結果、旧世界ザルのCαヒンジ領域には21塩基タイプと27塩基タイプがあることがわかった。2つのタイプは調べた旧世界ザルの種を越えて観察され、両方のタイプをもつ